



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑧⑦ EP 0 471 758 B1

⑩ DE 690 28 526 T 2

⑤① Int. Cl. 6:  
G 01 N 33/483  
A 61 K 35/52  
G 01 N 21/64

②① Deutsches Aktenzeichen:	690 28 526.4
⑧⑥ PCT-Aktenzeichen:	PCT/US90/02324
⑧⑥ Europäisches Aktenzeichen:	90 907 724.0
⑧⑦ PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 90/13303
⑧⑥ PCT-Anmeldetag:	30. 4. 90
⑧⑦ Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	15. 11. 90
⑧⑦ Erstveröffentlichung durch das EPA:	26. 2. 92
⑧⑦ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	11. 9. 96
④⑦ Veröffentlichungstag im Patentblatt:	6. 2. 97

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①  
10.05.89 US 349669

⑦③ Patentinhaber:  
The United States of America, represented by the  
Secretary, U.S. Department of Commerce,  
Washington, D.C., US

⑦④ Vertreter:  
Schroeter Fleuchaus Lehmann & Gallo, 86152  
Augsburg

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

⑦② Erfinder:  
JOHNSON, Lawrence, A., Silver Spring, MD 20904,  
US

⑤④ VERFAHREN ZUR VORWAHL DES GESCHLECHTS DER NACHKOMMENSCHAFT

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 690 28 526 T 2

BEST AVAILABLE COPY  
DE 690 28 526 T 2

## Gebiet der Erfindung

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Vorwählen des Geschlechts von Abkömmlingen durch Sortieren von Sperma in X- und Y-Chromosomen-tragendes Sperma auf der Basis von Unterschieden im DNA-Gehalt.

## Beschreibung des Standes der Technik

10 Das Geschlecht von Tiernachkömmlingen ist für Viehzüchter wichtig. Da Milchbauern wenig Verwendung für die meisten Bullenkälber haben, würde die Verwendung von geschlechtsbestimmtem Samen zum Erzeugen nur weiblicher Tiere die Milchproduktion effizienter machen. Schweinezüchter könnten  
15 Schweinefleisch effizienter erzeugen, wenn sie in der Lage wären, nur weibliche Schweine zu vermarkten, da weibliche Tiere schneller als männliche Tiere wachsen.

Bei Rinder- und Schafzuchten wachsen die männlichen Tiere  
20 schneller als die weiblichen und werden daher für die Fleischproduktion bevorzugt.

Zusätzlich kann die Fähigkeit zur Spezifizierung männlicher oder weiblicher Abkömmlinge die für genetische Verbesserungen  
25 erforderliche Zeit verkürzen, da wünschenswerte Eigenschaften oftmals nur dem einen oder dem anderen Elternteil zugeordnet sind. Das Planen des Geschlechts von Rinderabkömmlingen wird bereits auf begrenzter Basis praktiziert. Das Verfahren besteht darin, Embryos aus der Kuh zu entnehmen, deren  
30 tielles Geschlecht zu bestimmen, und nur diejenigen mit dem gewünschten Geschlecht wieder zu implantieren. Jedoch könnte eine Möglichkeit, Sperma in männliche bzw. weibliche Abkömmlinge erzeugende Gruppen vor der Verwendung zur künstlichen Besamung zu trennen, den Gesamtwert der durch Embryoübertragung  
35 erzeugten Abkömmlingen steigern.

Jedes Lebewesen hat einen Satz gepaarter Chromosomen, die sämtliches zur Erhaltung des Lebens auch zum Fortpflanzen

neuen Lebens notwendiges genetisches Material tragen.

Alle Chromosomen außer einem Chromosomenpaar werden als Autosomen bezeichnet und tragen Gene für sämtliche Eigenschaften des Körpers, wie beispielsweise Haut, Haar- und Augenfarbe, ausgewachsene Körpergröße und Körpereigenschaften. Das verbleibende Paar wird als Geschlechtschromosomen bezeichnet. Sie tragen das genetische Material, welches das Geschlecht bestimmt. Ein Geschlechtschromosom wird als X, das andere als Y bezeichnet.

Ein Spermium vom männlichen Tier oder ein Ei vom weiblichen Tier enthält jeweils eines von jedem Autosomenpaar; zusätzlich enthält bei Säugern das Ei stets ein X-Chromosom, während das Spermium stets entweder ein X- oder ein Y-Chromosom trägt.

Wenn ein Spermium und ein Ei sich vereinigen und das Spermium das Y-Chromosom trägt, ist der Abkömmling männlich (XY); wenn jedoch das Spermium ein X-Chromosom trägt, wenn es sich mit dem Ei vereinigt, ist der sich ergebende Abkömmling weiblich (XX).

Der einzige festgestellte und meßbare Unterschied zwischen X- und Y-Spermien, der bekannt ist, und der sich als wissenschaftlich gültig erwiesen hat, ist ihr Unterschied im Desoxyribonucleinsäuregehalt (DNA-Gehalt). Das X-Chromosom ist größer und enthält geringfügig mehr DNA als das Y-Chromosom. Der Unterschied in der Gesamt-DNA zwischen X-tragendem Spermium und Y-tragendem Spermium beträgt 3,4% bei Ebersperma, 3,8% bei Bullensperma und 4,2% bei Rammlersperma.

Die DNA-Menge in einer Spermienzelle ist, wie in den meisten normalen Körperzellen, stabil. Deshalb kann der DNA-Gehalt eines individuellen Spermiums beobachtet und zur Differenzierung zwischen X- und Y-tragenden Spermien benutzt werden.

Da der Unterschied in der DNA-Masse in den Geschlechtschromo-

somen der meisten Säugern der einzige wissenschaftlich ausgewertete, meßbare Unterschied zwischen X- und Y-tragenden Spermien ist, sind die chromosomale Konstitution (Moruzzi, J. Reprod. Fertile, 57, 319 (1979)) und/oder die Messung der

5 DNA-Masse (Pinkel et al. (1), Science 218, 904 (1982), Pinkel et al. (2), Cytometry 3, 1 (1982); Johnson und Pinkel, Cytometry 7, 268 (1986); Johnson et al (1), Gam. Res. 16, 1 (1987); Johnson et al. (2), Gam. Res. 17, 203 (1987)) die einzigen verifizierbaren Mittel außer der Fertilität zur Be-

10 stimmung der Geschlechterzeugungsfähigkeit einer Spermienpopulation. Die Literatur beschreibt viele physikalische, biochemische und funktionelle Methoden, die behauptetermaßen das Geschlecht von Spermien bestimmen (Amann und Seidel, "Prospects for Sexing Mammalian Sperm", Colorado Assoc. Univ.

15 Press, Boulder (1982)); mehrere dieser Verfahren sind auf relativen DNA-Gehalt getestet worden (Pinkel et al., J. Anim. Sci. 60, 1303 (1985); Johnson (1), Theriogenology 29, 265 (1988)). Jedoch hat sich keine Methode in kontrollierten Experimenten als tatsächlich das Geschlechtsverhältnis von

20 Nachkommen beeinflussend erwiesen.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß der Unterschied in dem DNA-Gehalt zwischen X- und Y-Chromosomen enthaltenden Spermien wiederholbar gemessen und das Spermiengeschlechts-

25 verhältnis einer Samenprobe vorhergesagt werden kann (Johnson und Pinkel, siehe oben; Johnson et al (1) siehe oben; Johnson et al (2), siehe oben; Johnson (1), siehe oben; Johnson (2), Cytometry Suppl. 2, 66 (Abstract) (1988)). Eine verifizierbare Trennung durch Sortieren von X- und Y-Spermien auf der

30 Basis des DNA-Gehalts ist bei der Wühlmaus bewerkstelligt worden (Pinkel et al (1), siehe oben; Johnson, "Beltsville Symposia in Agricultural Research X", P.C. Augustine, H.D. Danforth, & M.R. Bakst (Herausgeber), Martinus Nijhoff, Boston, Seiten 121 bis 134 (1986)), und beim Chinchilla

35 (Johnson et al (1, siehe oben)). Jedoch führten die Zubereitungsprozeduren zur Schädigung der DNA-Lebensfähigkeit. Das Sortieren von Spermienkernen von verschiedenen Säugertierarten (Bulle, Eber, Rammeler, Wühlmaus, Chinchilla) in

getrennte X- und Y-Chromosomen tragende Populationen mit Reinheiten im Bereich von 92 bis 99% ist ebenfalls schon durchgeführt worden (Johnson und Clarke, Gam. Res. 21, 335 (1988)). Kerndekondensation und Vorkernentwicklung wurde in  
5 Hamstereiern demonstriert, die mit sortierten X- oder Y-tragenden Bullen-, Eber- oder Rammlerspermien mikroinjiziert worden sind (Johnson und Clarke siehe oben).

Die WO 84/01265 beschreibt ein Verfahren zur Geschlechtsbe-  
10 stimmung lebensfähiger Spermienzellen unter Verwendung eines Zellzytometers in Kombination mit selektiven Markieren von Spermienzellen mit fluoreszentem Farbstoff. Es wird vorgeschlagen, Säugerspermien vor dem Färben bei zwischen 35° und 38,5°C zu lagern. Danach werden die Spermien in Berührung mit  
15 einer Farbstofflösung für eine Dauer von mindestens einigen Minuten, gewöhnlich aber für eine Periode von mindestens 15 Minuten gebracht, um eine gute Farbstoffeindringung sicher zu stellen. Im allgemeinen wird für Säugerspermien ein Zellmembran-Diffusionsmaterial wie beispielsweise DMSO oder sper-  
20 mienfreies menschliches Sperma zugegeben, so daß der Farbstoff in die Spermienzellen eindringen kann.

In Chemical Abstracts 105 (3), 22315V (1986, Fraser, L.R.) wird beschrieben, daß Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit  
25 von Mäusespermien in vitro durch das Einführen von Rinderserumalbumin mit niedriger Konzentration (0,05 bis 0,1mg/ml) verbessert werden könne.

#### Zusammenfassung der Erfindung

30

Aufgabe dieser Erfindung ist es, ein Verfahren zum Sortieren von Säugerspermien in X- und Y-Chromosomenfraktionen auf der Basis des DNA-Gehalts zu schaffen.

35 Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Färben der DNA von Säugerspermien bei Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit der Spermien anzugeben.

### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Es wurde nun die Trennung von intakten lebensfähigen X- und Y-Chromosomen tragende Kaninchen- und Schweinespermienpopulationen auf der Basis des relativen DNA-Gehalts durch Strömungssortierung, die künstliche Befruchtung von weiblichen Tieren mit den sortierten Spermien, und die nachfolgende Geburt von geschlechtsbestimmten Nachkommen mit einem phänotypischen Geschlechtsverhältnis entsprechend den Vorhersagen auf der Basis des relativen DNA-Gehalts der sortierten Spermienpopulationen gezeigt.

Ein Strömungszytometer mißt die Menge von abgegebenen fluoreszierendem Licht, wenn das zuvor mit einem fluoreszenten Farbstoff behandelte Spermium durch einen Laserstrahl passiert. Der Farbstoff bindet sich an die DNA. Das fluoreszierende Licht wird durch eine optische Linsenanordnung gesammelt; das Signal wird zu einer Fotovervielfacherröhre geleitet, verstärkt und durch einen Computer analysiert. Da das X-Chromosom mehr DNA enthält als das Y-Chromosom, nimmt das weibliche Spermium X mehr Farbstoff auf und gibt mehr Fluoreszenzlicht ab als das männliche Spermium (Y).

Damit kleine Unterschiede in der DNA zwischen X und Y nachgewiesen werden können, müssen die Spermien einzeln hintereinander durch den Laserstrahl passieren, der den DNA-Gehalt des einzelnen Spermiums mißt.

Bei der orthogonalen Strömungszytometrie läßt man eine Suspension von mit einem Fluorfarbstoff gefärbten Einzelzellen in einer schmalen Strömung fließen, die eine Erregungsquelle (Laserstrahl) schneidet. Während Einzelzellen durch den Strahl hindurchpassieren, sammeln optische Detektoren das emittierte Licht, wandeln das Licht in elektrische Signale um, und die elektrischen Signale werden durch einen mehrkanaligen Analysierer analysiert. Die Daten werden als Mehrfach- oder Einfach-Parameter-Histogramme unter Verwendung der Zellenzahlen und der Fluoreszenz pro Zelle als Koordinaten

angezeigt.

Um ein orthogonales Strömungszytometriesystem zum Differenzieren zwischen X- und Y-tragender Spermien-DNA einsetzen zu können, sind eine kegelige Probeninjektionsspitze und ein zweiter Fluoreszenzdetektor in der vorderen Position erforderlich (Johnson und Pinkel, siehe oben). Dieses Papier wird hier durch Bezugnahme einbezogen. Das modifizierte System ermöglicht die Steuerung der Orientierung des flachen eiförmigen Spermienkopfes, während er den Laserstrahl passiert. Ein Eliminieren des nichtorientierten Spermiums durch elektronische Torsteuerung steigert die Genauigkeit. Typischerweise sind 80% der Spermienkerne (ohne Schwänze) richtig orientiert, während sie den Laserstrahl passieren.

In dem modifizierten Epics-V (eingetragene Marke) Strömungszytometer/Zellensortierer orientieren auf die flachen eiförmigen Säugerspermienkerne ausgeübte hydrodynamische Kräfte die Kerne in der Ebene des Probenstroms, während sie die kegelige Injektionsspitze verlassen. Die Fluoreszenzsignale werden gleichzeitig durch optische Detektoren bei 90° und 0° von der Kante und der flachen Seite des Spermienkerns aufgenommen. Zum Sortieren wird der Probenstrom durch einen Ultraschallwandler in gleichförmige Tröpfchen aufgebrochen. Tröpfchen, die ein einzelnes Spermium mit der entsprechenden Fluoreszenzintensität enthalten, erhalten eine Ladung und werden elektrostatisch in Sammelgefäße abgelenkt. Die gesammelten Spermienkerne können dann zur Mikroinjektion in Eier verwendet werden. Da die Spermienkerne keine Schwänze haben, können sie nicht für eine normale Befruchtung verwendet werden.

Eine genaue Messung des Säugerspermien-DNA-Gehalts unter Verwendung der Strömungszytometrie und die Zellensortierung sind schwierig, da der Spermienkern in hohem Maße kondensiert ist und eine flach Form hat, was eine stöchiometrische Färbung schwierig macht und einen hohen Brechungsindex der gefärbten Kerne verursacht. Diese Faktoren tragen dazu bei, daß

die Emission der Fluoreszenz bevorzugt von der Kante bzw. der dünnen Ebene des Spermienkerns aus erfolgt. In den meisten Zytometern und Sortierern ist die Richtung der Probenströmung orthogonal zur Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls und zu den optischen Achsen der Fluoreszenzmessung. Infolgedessen ist die Fluoreszenzmessung am genauesten, wenn die Spermienfluoreszenz erregt und auf einer zur Ebene des Spermienkopfes senkrechten Achse gemessen wird (Pinkel et al (2), siehe oben). Bei verhältnismäßig niedrigen Probendurchsatzraten werden die hydrodynamischen Eigenschaften zum Orientieren schwanzloser Spermien benutzt, so daß der DNA-Gehalt bei 60 bis 80% der vor dem Laserstrahl passierenden Spermien präzise gemessen werden kann. Das bei dieser Untersuchung verwendete modifizierte Epics-V (eingetragene Marke) System kann den DNA-Gehalt schwanzloser Spermien der meisten Arten bei einem Durchsatz von 50 bis 150 Spermien pro Sekunde messen (Johnson und Pinkel siehe oben).

Intakte Spermien (mit Schwänzen), ganz gleich ob lebensfähig oder nicht lebensfähig, können nicht so effektiv wie schwanzlose Spermienkerne orientiert werden (Johnson (2), siehe oben). Jedoch kann ein 90°-Detektor eingesetzt werden, um die Population richtig orientierter intakter Spermien zu wählen, die von dem 0°-Detektor gemessen werden. Da keine hydrodynamische Orientierung versucht wird, kann die Probendurchsatzrate viel höher sein, was in gewisser Weise die Tatsache kompensiert, daß nur 15 bis 20% der intakten Spermien in der richtigen Orientierung durch den Laserstrahl passieren. Bei dieser Erfindung war die Gesamtdurchsatzrate etwa 2500 intakte Spermien pro Sekunde. Die intakten X- und Y- tragenden Spermienfraktionen wurden gleichzeitig aus dem Eingangssperma mit einer Rate von 80 bis 90 Spermien jedes Typs pro Sekunde sortiert. Es ist natürlich von kritischer Wichtigkeit, während des Sortierprozesses und während der Lagerung nach dem Sortieren und vor der Befruchtung eine hohe Lebensfähigkeit der intakten Spermien aufrechtzuerhalten. Von den an der Aufrechterhaltung der Spermienlebensfähigkeit beteiligten Faktoren haben sich das Verfahren zum Färben der Mantelflüssig-



keit und der Sammelflüssigkeit als besonders bedeutsam erwiesen.

Es muß eine nichttoxische DNA-Färbung gewählt werden. Ein  
5 bevorzugtes Färbemittel ist Hoechst Bisbenzimid H 33342-  
Fluorochrom (Calbiochem-Behring Co., La Jolla, CA). Nach  
unserer Kenntnis ist dieses Fluorochrom der einzige sich an  
DNA bindende Farbstoff, der für Spermien nicht toxisch ist.  
Die Konzentration des Fluorochroms muß minimal sein, um  
10 Toxizität zu vermeiden, aber trotzdem ausreichend sein, um  
die Spermien gleichförmig zu färben und kleinen Differenzen  
in der DNA der X- und Y-Spermien mit minimaler Schwankung  
nachweisen zu können. Als geeignete Konzentration wurde  
5 µg/ml ermittelt, aber diese kann von 4 bis 5 µg/ml variiert  
15 werden.

Die Spermien müssen bei ausreichender Temperatur und während  
ausreichender Zeit mit Farbstoff inkubiert werden, damit die  
Färbung stattfinden kann, jedoch unter genügend milden Bedin-  
20 gungen, um die Lebensfähigkeit zu bewahren. Eine Inkubation  
während einer Stunde bei 35°C wäre auch noch wirksam. Die  
Inkubationszeit muß entsprechend der Temperatur eingestellt  
werden, d.h. 1,5 Stunden bei 30°C; 1 Stunde bei 39°C.

25 Die beim Sortieren der Zellen verwendete Mantelflüssigkeit  
muß elektrisch leitend und isotonisch sein. Eine Konzentra-  
tion von 10 mM phosphatgepufferter Salzlösung stellte die  
notwendigen elektrischen Eigenschaften her, und 0,1% Rinder-  
serumalbumin wurde zugegeben, um die Spermienlebensfähigkeit  
30 durch Bereitstellen von Protein zur Unterstützung des Stoff-  
wechsels und für die Viskosität des Spermas zu fördern. Die  
Mantelflüssigkeit muß frei von Zuckern und überschüssigen  
Salzen sein.

35 Die Verdünnung des Spermas, die beim Sortieren auftritt,  
neigt dazu, die Lebensfähigkeit der Zellen zu verringern. Zur  
Überwindung dieses Problems wurden Spermien in Testeidotter-  
Streckmittel gesammelt (Graham et al., J. Dairy Sci. 55,372

(1972)), das durch Einstellen des pH-Werts und Zugabe eines Oberflächenent Spannungsmittels modifiziert wurde. Einzelheiten der Zusammensetzung des Streckmittels sind in Beispiel 1 angegeben. Das Oberflächenent Spannungsmittel vergrößert vermutlich die Befruchtungsfähigkeit der Spermien vor der Befruchtung.

Zur Bestätigung des DNA-Gehalts und Vorhersage des Geschlechts der Abkömmlinge von künstlich befruchteten Y- bzw. X-sortierten Spermienfraktionen wurde ein Aliquot des sortierten Spermas schallbeaufschlagt, um die Schwänze zu entfernen, gefärbt, und die Kerne wurden erneut auf den DNA-Gehalt analysiert, um den Anteil von X- und Y-Spermien vorherzusagen.

15

Obwohl bei der folgenden detaillierten Beschreibung die Sortierung von Kaninchenspermien als Beispiel der Erfindung benutzt wird, ist zu erwarten, daß das Sperma der meisten Säuger durch Anwendung dieser Verfahren effektiv sortiert werden kann.

20

Kaninchensamen wurde gesammelt, verdünnt und mit Fluorchrom-Farbstoff gefärbt. Die Spermien wurden in einem modifizierten Epics-V (eingetragene Marke) Strömungszytometer/Zellensortierer sortiert.

25

Nach dem Sortieren wurden die Spermien künstlich in die Uteri von Kaninchen eingebracht.

Die durch künstliche Befruchtung von Weibchen erhaltenen Ergebnisse mit sortierten intakten Spermien sind in Tafel 1 dargestellt. Die Untersuchung von Eiern 40 Stunden nach der Befruchtung zeigte, daß gefärbte sortierte Spermien ebenso wie ungefärbte unsortierte Spermien zur Befruchtung von Kanincheneiern in vitro fähig waren.

35

Tafel I  
Befruchtungsfähigkeit von strömungssortierten  
Kaninchen-Spermatozoen nach intrauteriner Befruchtung  
von Weibchen

5

Anzahl von

10	Spermien- behandlung	befruchtete Weibchen	Ovalations- punkte	untersuchte Eier	befruchtete Eier
	Unsortiert	2	16	9	9
15	Sortiert	6*	59	46	39

\*Ein Weibchen hatte 7 untersuchte und 7 unbefruchtete Eier.

Tafel II

Vorhergesagte und tatsächliche Geschlechtsverhältnisse  
 von Abkömmlingen nach intrauteriner Befruchtung mit  
 sortierten X- und Y-Chromosomen tragenden  
 Kaninchenspermien

Spermien- behandlung	Anzahl Weibchen		Prozentsatz und Anzahl der Abkömmlinge					
	befruchtet	geworfen	Gesamtzahl geborener Jungen	vorhergesagt		tatsächlich		
				% männlich	% weiblich	% männlich	% weiblich	
Sortiert Y	16	5	21	81	19	81 (17)	19 (4)	
Sortiert X	14	3	16	14	86	6 (1)	94 (15)	
X und Y wieder kombiniert	17	5	14	50	50	43 (6)	57 (8)	
Gesamt	47	13	51	--	--	47 (24)	53 (27)	

Befruchtungen wurden auch durchgeführt, um die Vergleichbarkeit des vorhergesagten Geschlechts von Abkömmlingen zum phänotypischen Geschlecht zu bestimmen. Wie die Daten in Tafel II zeigen, war die Vorhersagbarkeit des phänotypischen Geschlechts auf der Basis der DNA-Analyse der getrennten intakten Spermien sehr hoch. Die erneute Analyse der zur Befruchtung verwendeten sortierten Y-Population zeigte, daß 81% der Spermien Y-tragend waren. Das Geschlechtsverhältnis der Nachkommen aus diesen Befruchtungen war identisch mit dem vorhergesagten. Diese Werte waren beträchtlich verschieden von den theoretischen 50 : 50 Geschlechtsverhältnissen ( $P < 0,003$ ). Die erneute Analyse der für die Befruchtung verwendeten sortierten X-tragenden Spermienpopulation zeigte, daß 86% X-tragende und 14% Y-tragende Spermien waren. Das phänotypische Geschlecht der Abkömmlinge von diesen Befruchtungen war zu 94% weiblich, was von dem theoretischen Verhältnis 50 : 50 ( $P < 0,003$ ) verschieden ist.

Befruchtungen wurden auch mit sortierten X- und Y-Populationen durchgeführt, die unmittelbar vor der Befruchtung wieder kombiniert wurden (rekombinierte X- und Y-Gruppe). Es wurde die Annahme gemacht, daß die Anteile von X und Y in den rekombinierten Proben gleich waren (50 : 50). Das aus den Befruchtungen resultierende phänotypische Geschlecht war 57% weiblich und 43% männlich (Tafel II) und war nicht signifikant von dem theoretischen Geschlechtsverhältnis (50 : 50) verschieden ( $P = 0,40$ ). Das phänotypische Geschlechtsverhältnis der geborenen Abkömmlinge von entweder mit sortierten X-tragenden oder sortierten Y-tragenden Spermien befruchteten Weibchen war von dem von unbehandeltem Samen erwarteten theoretischen Geschlechtsverhältnis (50 : 50) verschieden ( $P < 0,002$  für X und  $P < 0,001$  für Y).

Die embryonale Sterblichkeit in den mit sortierten intakten Spermien befruchteten Weibchen war beträchtlich. Bei einer vernünftig hohen Befruchtungsrate (Tafel I) würde man eine Wurfrate von nahezu 80% und eine Wurfgröße von etwa 6 von Weibchen dieses Alters und dieser Art erwarten. Jedoch betrug

- die Wurfrate bei den drei Behandlungsgruppen im Mittel nur 28% mit einer mittleren Wurfgröße von 3,9. Die Ursache der ersichtlich hohen Embryonensterberate wird bei der Fluorochrom-Bindung an die DNA und/oder der Einwirkung des Laserstrahls zur Erregung des DNA-gebundenen Fluorochroms vermutet. Frühere Arbeiten haben gezeigt, daß sortierte Mäuspermienkerne, die in Hamstereier mikroinjiziert wurden, Chromosomenbrüche in dem sich entwickelnden Spermiovorkern auftreten (Libbus et al., Mut. Res. 182,265 (1987)). Diese Spermien sind schallbeaufschlagt, gefärbt, sortiert und mikroinjiziert worden, was eine etwas gröbere Behandlung als das Färben und Sortieren in dieser Untersuchung darstellt.
- Es wurde gezeigt, daß die DNA als differenzierendes Kriterium zwischen X- und Y-tragenden Spermien benutzt werden kann, daß DNA zur genauen Vorhersage des Geschlechts von Abkömmlingen von getrennten X- und Y-tragenden Spermienpopulationen benutzt werden kann, und daß die Strömungssortierung ein effektives Mittel zum Trennen lebensfähiger X- und Y-tragender Spermienpopulationen darstellt, die zur Erzeugung von Abkömmlingen geeignet sind.

Die folgenden Beispiele dienen nur zur weiteren Illustration der Erfindung und sollen den Schutzbereich der Erfindung nicht begrenzen, der durch die Patentansprüche definiert ist.

#### Beispiel 1

- Es wurde Samen von ausgewachsenen Rammeln gemischter Arten unter Verwendung einer künstlichen Vagina gesammelt. Die Spermienkonzentration wurde mit einem Hämozytometer bestimmt. Der Samen wurde mit Tris-Buffer, pH-Wert 6,9, auf eine Konzentration von  $10 \times 10^6$  pro ml verdünnt. Bisbenzimid-H-33342-Fluorochrom wurde mit einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Die Proben wurden während einer Stunde bei 35°C inkubiert. Intakte Spermien wurde auf einem modifizierten Epics-V (eingetragene Marke) Strömungszytometer/Zellensortierer sor-

- tiert. Die gefärbten intakten Spermien wurden in den ultravioletten Linien (UV; 361 nm und 364 nm) Linien eines 5-Watt 90-5-Innova (eingetragene Marke) Argonionenlaser erregt, der mit 2000 mW arbeitete. Die Daten wurden als 256-Kanal-Histogramme gesammelt. Die Mantelflüssigkeit war 10 mM phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), die 0,1% Rinderserumalbumin (BSA) enthielt. Die Spermien wurden in ein Testeidotter-Streckmittel sortiert.
- 5
- 10 Die Zusammensetzung des Streckungsmittels war N-Tris (Hydroxymethyl)-Methyl-2-Amino-Ethansulfonsäure, 2,16 g; Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan 0,51 g; Dextrose 0,1 g; Streptomycin-Sulfat 0,13 g; Penicillin G 0,08 g; Eidotter 12,5 ml; Equex STM (Nova Chemical Sales, Scituate, MA) 0,5%;
- 15 und destilliertes Wasser 50 ml. Dieses Gemisch wurde zentrifugiert und nur der Überstand wurde verwendet. Die sortierten Spermien wurden durch Inkubieren bei Raumtemperatur während einer Stunde konzentriert, wonach die dünnere Fraktion entfernt wurde und der Rest zur Befruchtung 1 bis 4 Stunden
- 20 später benutzt wurde.

## Beispiel 2

- Ausgewachsene Weibchen von Weißen Neuseeländer Kaninchen
- 25 wurden 150 internationale Einheiten menschliches Choriongonadotropin (HOG) zum Hervorrufen des Eisprungs injiziert, der 10 Stunden später erwartet wurde. 7 Stunden nach der Behandlung mit HOG wurden die Weibchen durch Injektion mit Ketamin-Hydrochlorid, das Azepromazin enthielt, chirurgisch
- 30 vorbereitet und unter Halothan und Sauerstoff anästhesiert. Der Uterus wurde durch Mittelschnitt freigelegt, und 100 µl sortierte bzw. unsortierte Spermien wurden in das Lumen der vorderen Spitze jedes Uterushorns durch eine Nadel der Größe 21 eingebracht. Bei der Versorgung der Kaninchen wurden
- 35 übliche Maßnahmen angewendet. Diese Weibchen wurden 40 Stunden nach der Befruchtung getötet; die Uteri wurden gespült und die herausgenommenen Eier ausgewertet. Alle herausgeholtten befruchteten Eier wurden als Morula klassifiziert. Die

Ergebnisse dieser Experimente sind in Tafel I gezeigt.

### Beispiel 3

5   Tafel II zeigt die Ergebnisse der in die Spitze des Uterus-  
horns vorgenommenen Befruchtungen: Die Anzahl der Weibchen,  
die geworfen haben, und das phänotypische Geschlecht der Ab-  
kömmlinge im Vergleich zum vorhergesagten Geschlecht. Das  
vorhergesagte Geschlecht der Abkömmlinge basierte auf einer  
10 erneuten Analyse der sortierten intakten Spermien zur Be-  
stimmung des relativen DNA-Gehalts. Zur erneuten Analyse  
wurden die sortierten Spermien während 10 s schallbeauf-  
schlagt und mit 15.000 g zentrifugiert, der Überstand wurde  
weggeschüttet, und das Pellet wurde in 9  $\mu$ M Bisbenzimid  
15 H 33342 resuspendiert. Das phänotypische Geschlecht der Ab-  
kömmlinge wurde bald nach der Geburt bestimmt und in späteren  
Altersstufen bis zu 10 Wochen bestätigt. Rekombiniertes X und  
Y sind die sortierten X- und Y-Spermienpopulationen, die un-  
mittelbar vor der Befruchtung rekombiniert wurden.

20

### Beispiel 4

Unter Verwendung der Methoden nach den Beispielen 1, 2 und 3  
wurden lebensfähige Schweinespermien in lebensfähige X- und  
25 Y-Chromosomen tragende Populationen sortiert. Zwei Würfe (18  
Ferkel) von künstlich eingebrachtem Ebersamen erzeugten 88%  
weibliche Ferkel von X-sortierten Spermien und 67% männliche  
Ferkel von Y-sortierten Spermien.



Patentansprüche

1. Verfahren zum Vorwählen des Geschlechts von Säuger-Abkömmlingen, das umfaßt:

5

a) Färben von von einem männlichem Säuger erhaltenem lebensfähigem intaktem Sperma mit einem fluoreszierenden nichttoxischen Farbstoff, der in der Lage ist, DNA in lebenden Zellen selektiv zu färben, indem das Sperma bei einer Temperatur im  
10 Bereich von 30 bis 39°C während einer Zeitspanne inkubiert wird, die ausreichend lang ist, damit ein gleichförmiges Färben stattfinden kann, die aber auch ausreichend kurz ist, damit die Lebensfähigkeit des Spermas erhalten bleibt,

15 b) Einführen des Spermas in eine elektrisch leitende und isotonische, die Lebensfähigkeit unterstützende Trägerflüssigkeit, um eine Suspension von Spermien herzustellen, die einzeln in der Trägerflüssigkeit transportiert werden,

20 c) Vorbeiführen der die Spermien enthaltenden Trägerflüssigkeit an einer Anregungslichtquelle, die das Fluoreszieren der gefärbten DNA bewirkt,

d) Hindurchführen der die Spermien enthaltenden Trägerflüssigkeit sowohl durch eine Einrichtung zum Nachweis der Fluoreszenz der gefärbten DNA und außerdem durch eine Zellsortiereinrichtung, wobei die Einrichtung zum Nachweis der Fluoreszenz mindestens zwei so angeordnete Detektoren aufweist, daß ein erster Detektor die Orientierung von Spermien  
25 auf der Basis der Fluoreszenzstärke bestimmt und einen zweiten Detektor zur Messung des DNA-Gehalts von Spermien auf der Basis der Fluoreszenzstärke dieser Spermien steuert, die als in einer vorgewählten Orientierung befindlich bestimmt worden sind,

35

e) mittels der Zellsortiereinrichtung Auswählen der Spermien, die einen einem gewünschtem Chromosom, das das gewünschte Nachkommengeschlecht erzeugt, entsprechenden DNA-

Gehalt hat, und Abtrennen der ausgewählten Spermien von nichtausgewählten Spermien und,

f) Sammeln der ausgewählten Spermien in einer die Lebens-  
5 fähigkeit unterstützenden Sammelflüssigkeit.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Säuger ein Kaninchen ist.

10 3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Säuger ein Schwein ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Säuger ein Rind ist.

15 5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Inkubation bei einer Temperatur von etwa 39°C während einer Zeitdauer von etwa einer Stunde erfolgt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Inkubation bei einer  
20 Temperatur von etwa 35°C während einer Periode von etwa einer Stunde erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Inkubation bei einer  
Temperatur von etwa 30°C während etwa 1,5 Stunden erfolgt.

25

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Trägerflüssigkeit phosphatgepufferte Salzlösung ist, und wobei die Lösung außerdem 0,1% Rinderserumalbumin zur Förderung der Spermienlebensfähigkeit enthält.

30

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Sammelflüssigkeit modifiziertes Testeigeln-Streckmittel ist.

10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Spermien in der  
35 Trägerflüssigkeitsströmung hydrodynamisch orientiert werden, bevor diese an der Lichtquelle vorbeigeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Spermien in der Trägerflüssigkeitsströmung hydrodynamisch orientiert werden, indem die Flüssigkeit in Form einer engen Strömung durch eine kegelige Injektionsspitze hindurchgeführt wird, bevor sie an  
5 der Lichtquelle vorbeigeführt wird.

12. Verfahren zur Vorbestimmung des Geschlechts nichtmenschlicher Säugetiernachkommen, das umfaßt:

10 a) Vorwählen von Spermien nach dem Verfahren nach Anspruch 1, und

b) Befruchten eines Eis aus einem nichtmenschlichem weiblichen Säugetier der gleichen Art wie das nichtmenschliche  
15 männliche Säugetier mit dem ausgewählten Sperma in der Sammelflüssigkeit.

13. Verfahren zur Vorbestimmung des Geschlechts von Säugernachkommen, das umfaßt:

20

a) Vorwählen von Spermien nach dem Verfahren nach Anspruch 1, und

b) In-Vitro-Befruchten eines Eis eines weiblichen Säugers der  
25 gleichen Art wie der männliche Säuger mit dem ausgewählten Sperma in der Sammelflüssigkeit.

14. Verfahren nach Anspruch 1, das außerdem mittels eines elektronischen Torsystems das Eliminieren von Spermien um-  
30 faßt, die nicht richtig orientiert sind, bevor das Sortieren in der Zellsortiereinrichtung stattfindet.

15. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Spermienströmung durch die Zellsortiereinrichtung durch einen Ultraschall-  
35 wandler reguliert wird.

16. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Spermien auf der Basis des X- oder Y-Chromosomen-DNA-Gehalts mit etwa 90%

Effizienz sortiert werden.

17. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Spermien in der  
Trägerflüssigkeit hydrodynamisch orientiert werden, und  
5 Spermien, die nicht richtig orientiert sind, mittels eines  
elektronischen Torsystems vor dem Vorbeiführen an der Licht-  
quelle eliminiert werden.

18. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Farbstoff  
10 Bisbenzimid-H33342-Fluorchrom ist.

BEST AVAILABLE COPY

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**